

日本人肺MAC症患者由来株と韓国人肺MAC症患者由来株の遺伝学的特徴の違い

^{1,3}新美 政樹 ³打矢 恵一 ⁴八木 哲也 ^{1,6}高橋 弘泰
^{1,3}黒河 和広 ^{1,5}市川 和哉 ^{1,3,7}稲垣 孝行 ^{1,3,8}森山 誠
³二改 俊章 ²林 悠太 ^{1,2}中川 拓 ^{1,2}小川 賢二

要旨：〔目的〕日本の *Mycobacterium avium* の特徴を解明するため、国別における *M. avium* の遺伝学的特徴を検討した。〔方法〕菌株は、韓国株（n=119）、日本株（n=76）を用い、*Mycobacterium avium* tandem-repeat variable-number tandem-repeat（MATR-VNTR）型別解析法や新規挿入配列 IS *Mav6* の保有状況を比較した。〔結果〕系統樹を作成した結果、日本株と韓国株で異なる Cluster を形成した。また、IS *Mav6* の保有状況では有意差を認め（日本株：75.0%，韓国株：59.8%， $P<0.035$ ），さらに、*cfp29* 遺伝子の Shine-Dalgarno（SD）配列に IS *Mav6* が挿入されている菌株では、IS *Mav6* の保有率以上に強い有意差が認められた（日本株：38.2%，韓国株：12.4%， $P<0.001$ ）。〔考察〕日本、韓国において蔓延している *M. avium* は、遺伝学的に異なる可能性が考えられた。今後、他の国の *M. avium* の VNTR 型別解析法や IS *Mav6* の保有状況を検討し、肺 MAC 症の増加原因の究明を目指していきたい。

キーワード：*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium* tandem-repeat variable-number tandem-repeat（MATR-VNTR）型別解析法, IS *Mav6*, *cfp29*, クラスター形成

緒 言

抗酸菌は、100種類以上存在し、その中の約3分の1がヒトに対して感染すると報告されている¹⁾。抗酸菌の中でも Nontuberculous mycobacterium（NTM）は、自然界の水系、土壤中、塵埃中や風呂場などから分離され²⁾、環境中からの菌を含んだエアロゾルの曝露により感染すると報告されているが³⁾、明確な感染経路は特定されていない。また、抗酸菌症の罹患率に占める割合は、結核の減少に対して NTM 症が増加してきている⁴⁾。日本における NTM 症の罹患率は、1970年代で10万対1.01であったが、最近の疫学調査において6.3と増加している。アメリカやヨーロッパでの NTM 症の罹患率は、日本と同時期にそれぞれ10万対2.0、10万対2.9となっており、他の国に比べ日本で顕著に多いことがわかる^{5)~7)}。NTM 症の中でも *Mycobacterium avium* complex（MAC）症が特に増加している⁸⁾。MAC 症は、*Mycobacterium avium*（*M.*

avium）と *M. intracellulare* の2つの近縁の菌による感染症であり、化学的性質に加えて臨床的症状においても類似している。MAC 症の中でも *M. avium* は、一般的に免疫不全状態での全身播種性疾患を引き起こす日和見感染症として知られているが、日本においては、肺に器質的病変をもたない中高年女性の間で肺病変を形成する *M. avium* 感染症が増加していると報告されている⁹⁾。これらの要因が宿主側あるいは菌側に由来するのか、未だ解明されていない。一方、韓国でも肺 MAC 症は増加傾向にあるが、*M. avium* 感染症よりも *M. intracellulare* 感染症のほうが2倍以上多いことが報告されており¹⁰⁾、日本と韓国において主な病原菌種が異なっている。

近年、MAC 症の遺伝子研究は目ざましい発展を遂げており、*Mycobacterium avium* tandem-repeat（MATR）variable-number tandem-repeat（VNTR）を用いた分子疫学的解析法¹¹⁾や IS 901 flanking region 300（FR300）を用いた亜種解析法や新規挿入配列の IS *Mav6* などが報告さ

¹国立病院機構東名古屋病院臨床研究部、²同呼吸器内科、³名城大学薬学部微生物学研究室、⁴名古屋大学医学部附属病院中央感染制御部、⁵同薬剤部、⁶愛知県厚生連海南病院薬剤部、⁷高山赤十字病院薬剤部、⁸国立病院機構名古屋医療センター薬剤科

連絡先：打矢恵一，名城大学薬学部微生物学研究室，〒468-8503 愛知県名古屋市天白区八事山150
 (E-mail: kuchiya@meijo-u.ac.jp)
 (Received 8 Oct. 2011/Accepted 18 Jan. 2012)

れている。1998年に抗酸菌におけるVNTR型別解析法が報告され、*M.tuberculosis*などで分子疫学ツールとして用いられている¹²⁾。*M.avium*においては、2002年に西森らによって16種のVNTR領域を用いたMATR-VNTR型別解析法が開発され、臨床で応用されている¹³⁾。ただし、MATR-0の領域においては*M.avium* subsp. *paratuberculosis* 特異的挿入配列であるIS 900を含む領域であることが報告されており¹⁴⁾、この領域に関しては、臨床分離株で使用されていない。また、挿入配列 (Insertion sequence: IS) は、様々なバクテリアのゲノム上に存在し、菌の進化に関与する遺伝子再編成を促進しており、抗酸菌を含む多くの微生物において広く分布している¹⁵⁾。従来、IS 901やIS 1245における特異的な挿入配列の有無により亜種分類が行われてきた。しかし、これらの挿入配列を用いた分類法では、それぞれに相同性の高い挿入配列があり、PCRやプローブを用いたRestriction fragment length polymorphism (RFLP) において、ミスマッチが生じることや挿入配列の欠如している株において明確な亜種分類が困難であった¹⁶⁾。その後、2006年にIS 901の挿入箇所であるIS 901 flanking region 300 (FR 300)を用いた*M.avium* subsp. *avium* と *M.avium* subsp. *paratuberculosis* もしくは*M.avium* subsp. *hominissuis*を分類する方法¹⁷⁾や挿入配列以外の方法として*M.avium*のハウスキーピング遺伝子の一つである*hsp65*の3'フラグメントシーケンス解析による分類が提案され、亜種分類の方法が明確となった¹⁸⁾。一方、IS 901は、*M.avium* subsp. *avium*、*M.avium* subsp. *silvaticum*に特有であり、ヒトや環境からIS 901を保有する鳥型の*M.avium*が分離されることはほとんどないとされていた¹⁹⁾。しかし、ヨーロッパ諸国において、IS 901を保有している菌株がヒトから分離されたことが報告され²⁰⁾、その報告におけるIS 901の検出頻度は152株中12株(8%)であった。他の国においても同様に、ヒトから分離された菌株からIS 901が保有していても割合が低いか、保有していないことが報告されている²¹⁾。これに対し、Ichikawaら²²⁾の報告によると、日本人の臨床由来株から分離されたIS 901の保有率は、114株中76株(67%)と他の国に比べ高い保有率を示した。このIS 901は、シーケンス解析により、鳥型の*M.avium* subsp. *avium*や*M.avium* subsp. *silvaticum*が保有しているIS 901と比較して60個の塩基配列に違いがあったため、新規挿入配列IS *Mav6*と命名された。現在、IS *Mav6*の挿入位置が7カ所特定されており、そのうちの1つはGamma Interferon (IFN- γ)の誘導に関与している遺伝子*cfp29*²³⁾のShine-Dalgarno (SD) 配列に挿入されている(以下IS *Mav6* in *cfp29*)。IFN- γ は、抗酸菌に対する宿主防御に重要な役割を担っており、*cfp29*にIS *Mav6*が挿入していることでIFN- γ の産生を抑制させているのではな

いかと推測されている。

そこで、本研究では菌側に着目し、日本で増加している*M.avium*の特徴を解明するため、日本人肺MAC症患者由来株と韓国人肺MAC症患者由来株を用いて、国別の*M.avium*の遺伝学的特徴や地域性を検討した。

実験材料および方法

〔使用検体〕

独立行政法人国立病院機構東名古屋病院において、肺MAC症と確定診断された患者からの日本人肺MAC症患者由来*M.avium*株76検体(以下、日本株)と、韓国のSamsung Medical Centerから分与された韓国人肺MAC症患者由来*M.avium*株119検体(以下、韓国株)を用いた。

〔実験方法〕

(1) DNA抽出

菌体の培養は、抗酸菌用液体培地のMGITを用いて行った。MGITからMycoBrothに継代培養し、吸光度(530 nm)が0.2になるまで培養を行った。滅菌蒸留水1 mLを1.5 mLのエッペンドルフチューブに分注し、培養菌液100 μ Lを入れ、12000 rpm、1分間の遠心分離後、上清を捨て、200 μ LのINSTAGENE MATRIXを加え、ボルテックスにて均一の菌浮遊液を作成した。56℃の温浴にて20分間保温し、ヒーティングブロックにて100℃、8分間の処理をし、DNA抽出を行った。

(2) 菌種・亜種の同定

菌種の同定には、*hsp 65*-PRA法²⁴⁾を用いた。2 μ LのDNAテンプレートに10x buffer 5 μ L、2 mM dNTP mix 5 μ L、AmpliTaq GOLD DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L、Dimethylsulfoxide 1 μ L、25 μ Mのプライマー (F: 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3', R: 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3')を各1 μ Lそれぞれ加え、滅菌精製水で全量50 μ Lとした。95℃ 10分のプレヒーティング後、94℃ 45秒、60℃ 45秒、72℃ 1分の増幅サイクルを45回実行し、最後に72℃ 7分間の伸長反応を行った。得られたPCR産物10 μ Lを*Bst*E IIまたは*Hae* IIIでDNAを断片化し、その後4%アガロースゲルで泳動し、DNAフラグメントの解析を行った。

亜種の同定には、FR300の解析を行った。FR300における亜種同定は、Bartosら¹⁷⁾の方法を参考に行った。2 μ LのDNAテンプレートに10x buffer 5 μ L、2 mM dNTP mix 5 μ L、AmpliTaq GOLD DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L、25 μ Mのプライマー (F: 5'-CAGCCAGCCGAATGTCA TCC-3', R: 5'-CAACTCGCGACACGTTTACC-3')を各1 μ Lそれぞれ加え、滅菌精製水で全量50 μ Lとした。95℃ 10分のプレヒーティング後、94℃ 1分、66℃ 45秒、72℃ 1分の増幅サイクルを33回実行し、最後に72℃ 7分間の伸長反応を行った。得られたPCR産物を2%アガロー

スゲルで泳動し、DNAフラグメントの解析を行った。また、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* と *M. avium* subsp. *hominissuis* を分類するために IS 900 の保有の有無を PCR 法を用いて解析した。方法は下記に示す MATR-VNTR 型別解析法に従った。プライマーは MATR-0 (F: 5'-TCGGCCAGCTTGATCTTCTC-3', R: 5'-TCCGTAACCGT CATTGTCCA-3') を用いた¹²⁾。

(3) 分子疫学的解析法

稲垣らにより報告された MATR-VNTR 型別解析法に従い 15 種のプライマーを用いて行った¹¹⁾。2 μ L の DNA テンプレートに 10x PCR buffer 5 μ L, 2 mM dNTP mix 5 μ L, AmpliTaq GOLD DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 25 μ M のプライマーを各 1 μ L 加え、全量 50 μ L になるように滅菌精製水で調節した。95°C 10 分間のプレヒーティング後、98°C 10 秒, 68°C 30 秒, 72°C 1 分の増幅サイクルを 38 回実行し、最後に 72°C 7 分間の伸長反応を行った。PCR 産物は、2% アガロースゲルを TrackIt 50 bp DNA Ladder のサイズマーカーとともに電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは Gel-Doc で撮影し、解析ソフト Quantity-One を用いて対象の VNTR 領域の塩基対数を推定した。各 VNTR 領域の反復回数を求め、これをアリルプロファイルとした。得られたアリルプロファイルを基に系統樹を PHILIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/philip.html>) を用いて Fitch-Margoliash 法にて推定した。推定された系統樹データを Fig tree v.1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) で描画した。

(4) IS *Mav6* および IS *Mav6* in *cfp29* の保有状況

新規挿入配列 IS *Mav6* と IS *Mav6* in *cfp29* の保有状況について PCR 法を用いて解析した。IS *Mav6* の保有率については、Ichikawa らの方法に従った²²⁾。IS *Mav6* in *cfp29* の保有状況については、2 μ L の DNA テンプレートに 10x buffer 5 μ L, 2 mM dNTP mix 5 μ L, AmpliTaq GOLD DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 25 μ M のプライマー (F: 5'-GCTCGCTCACGTCGACCA-3', R: 5'-ATTTCTCCAC CGCGGTCAC-3') を各 1 μ L 加え、全量を 50 μ L になるように滅菌精製水で調節した。95°C 10 分間のプレヒーティング後、94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 1 分の増幅サイクルを 35 回実行し、最後に 72°C 7 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルで泳動し、DNA フラグメントの解析を行った。

(5) 統計解析

MATR-VNTR 型別解析法における系統樹解析および IS *Mav6*, IS *Mav6* in *cfp29* の保有率について、Chi-square test もしくは Fisher's exact test を用いた。

結 果

(1) 菌種・亜種の同定

hsp65-PRA 法を用いた菌種同定の結果、日本株 76 株すべて *M. avium* であり、韓国株 119 検体中 113 検体が *M. avium*, 6 検体は *M. avium* と *M. intracellulare* の混合感染と確認されたため、以後の解析から除外した。また、FR 300 と IS 900 の保有の有無の解析により亜種の同定を行った結果、日本株 76 検体と韓国株 113 検体はすべて *M. avium* subsp. *hominissuis* と判明した。

(2) MATR-VNTR 型別解析法

MATR-VNTR 型別解析法を行った結果、韓国株 113 検体のうち 14 検体は *M. avium* のポリクローナル感染が確認され、さらに 2 株は増幅の見られない領域があったため、これらを以後の解析から除外した。従って、日本株 76 検体と韓国株 97 検体を用いて系統樹を作成した。その結果、韓国株のみを含む Cluster V1 (韓国株: 10.4%, $P < 0.001$) と日本株を多く含む Cluster V2 (日本株: 20.8%, 韓国株: 6.36%, $P < 0.001$) を形成した (Fig. 1)。

(3) IS *Mav6* と IS *Mav6* in *cfp29* の保有状況

IS *Mav6* の保有率は、日本株と韓国株の間で有意差が認められた (日本株: 75.0%, 韓国株: 59.8%, $P < 0.035$)。また、IS *Mav6* in *cfp29* (Fig. 2) の保有率では、日本株と韓国株の間で IS *Mav6* の保有率以上に強い有意差が認められた (日本株: 38.2%, 韓国株: 12.4%, $P < 0.001$) (Table)。また、MATR-VNTR 型別解析法において Cluster V2 では、IS *Mav6* in *cfp29* positive の株を含む固有の Cluster を形成した (Fig. 1)。

考 察

本研究では、日本株と韓国株を用いて遺伝子解析を行い、国別による *M. avium* の遺伝学的特徴と地域性について検討した。

亜種同定において、今回用いた *M. avium* すべてが *M. avium* subsp. *hominissuis* であった。韓国でも日本と同様にヒトに感染する菌株は、*M. avium* subsp. *hominissuis* と判明した。また、MATR-VNTR 型別解析法により日本株と韓国株の比較を行った結果、日本株と韓国株では異なる Cluster を形成した。このことから、日本と韓国の *M. avium* は同じ亜種であるが、地域によって遺伝学的にタイプの異なる菌である可能性が示唆された。さらに、Cluster V2 に存在している韓国株は、日本株の特徴に類

Table Comparison of IS *Mav6* and IS *Mav6* in *cfp29* positive strains in Japan and Korea

	IS <i>Mav6</i> positive	IS <i>Mav6</i> in <i>cfp29</i> positive
Japan (n=76)	57 (75.0%)	29 (38.2%)
Korea (n=97)	58 (59.8%)	12 (12.4%)
P value	$P < 0.035$	$P < 0.001$
Fisher's exact test		

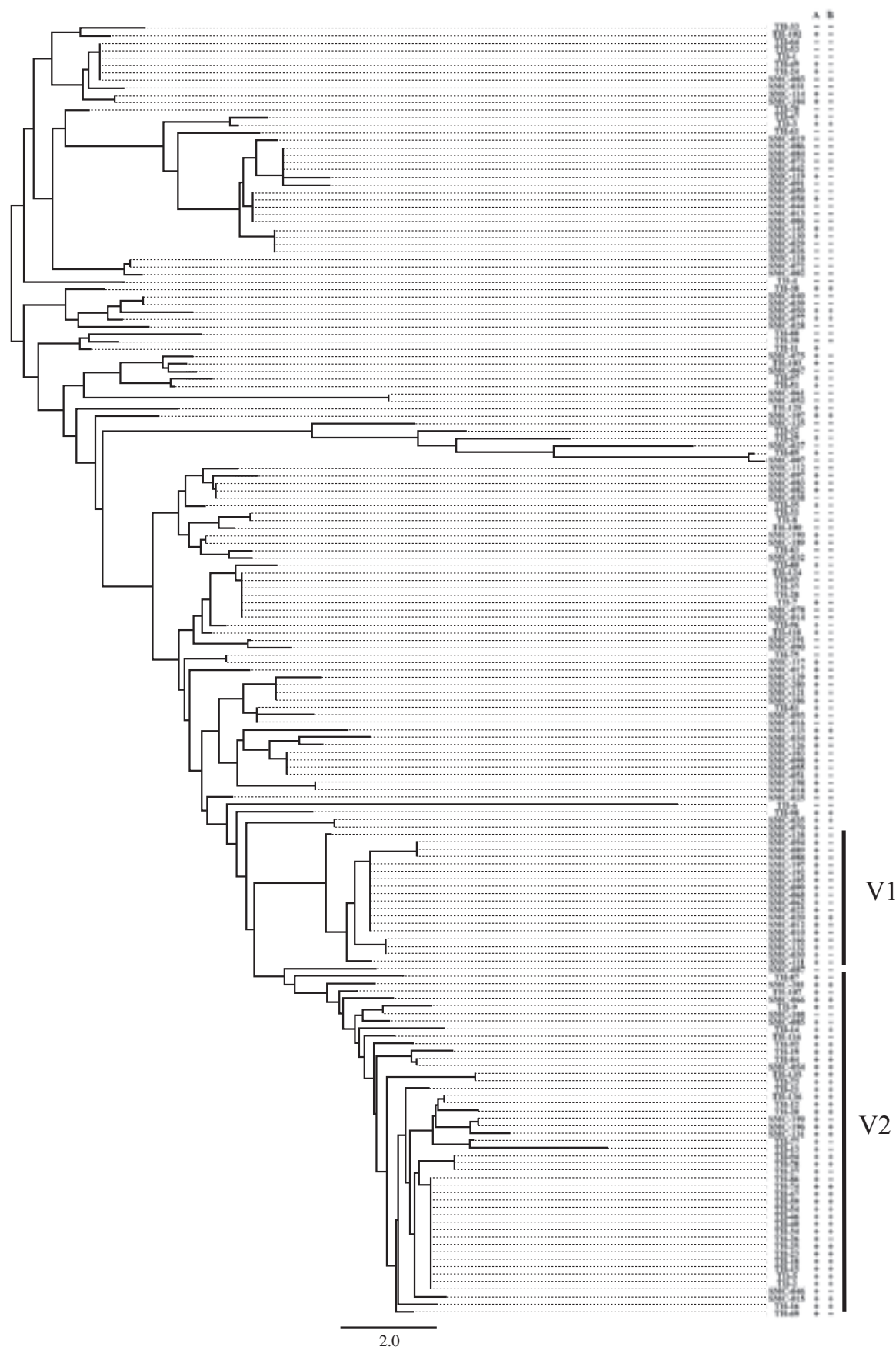


Fig. 1 Fourteen loci VNTR analysis dendrogram based on the allelic profiles of 173 isolates from patients of Japan and Korea. (TH: Japanese strain MAC; SMC: South Korean strain MAC)

V1: Cluster that contains of South Korean pulmonary MAC disease patients
 V2: Cluster that contains a lot of Japanese pulmonary MAC disease patients

A: ISMav6 B: ISMav6 in cfp29
 +: presence, -: absence

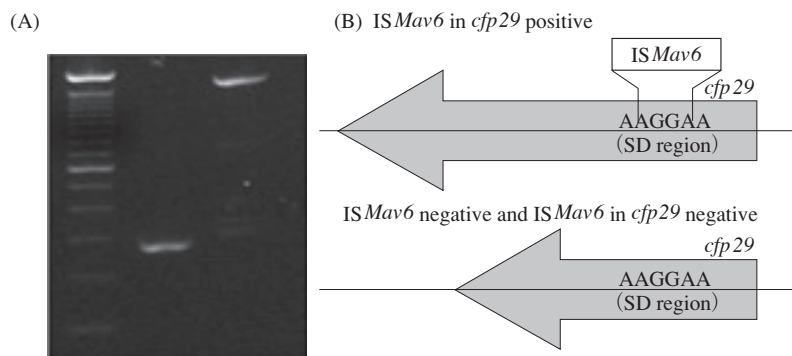


Fig. 2 (A) PCR products amplified by *cfp29* primers. (B) Schematic representation of the *cfp29* (A) Left lane, molecular weight ladder; middle lane, IS*Mav6* negative and IS*Mav6* in *cfp29* negative stain; right lane, IS*Mav6* in *cfp29* positive strain.

似した菌株であると考えられる。このCluster内の菌株が*M. avium*感染症の増加の原因菌と仮定すると韓国ではこのCluster内に存在する菌株が少ないため、日本と比較して*M. avium*感染症の増加が少ない可能性がある。一方、Cluster V2に含まれていない菌株は、日本と比較して*M. avium*感染症の罹患率がより低い国の菌株やIS*Mav6*やIS*Mav6* in *cfp29*の保有しない菌株を多く含む可能性が考えられた。

ヨーロッパ諸国において、ヒトから分離された*M. avium*はIS901をほとんど保有しておらず²¹⁾、日本の臨床分離株では、IS901と類似したIS*Mav6*を保有していることから、ヨーロッパ諸国やアメリカなどの菌株においてIS*Mav6*をほとんど保有していない可能性が考えられる。また、日本株で保有率が高いと報告されているIS*Mav6*は日本特有の挿入配列と報告されており²²⁾、日本株と韓国株の間で保有率に有意な差が認められたが、Clusterは形成しなかった。一方、IS*Mav6* in *cfp29*の保有率では、日本株と韓国株の間でIS*Mav6*の保有率以上に強い有意差が認められ、固有のClusterを形成した。さらに、IS*Mav6* in *cfp29*保有株のClusterは、日本株を多く含むCluster V2と一致していた。IFN- γ は、抗酸菌に対する宿主防御に重要な役割を担っており、IFN- γ の産生量が低い肺MAC症患者において治療に苦渋する⁴⁾と報告されている。従って、IS*Mav6*が*cfp29*に挿入されることでIFN- γ の産生が抑制され、*M. avium*に対する免疫機能が低下すると考えられ、これが日本での*M. avium*の増加の原因の一つである可能性がある。

以上の結果から、日本株と韓国株では、MATR-VNTR型別解析法による系統樹において異なるClusterを形成したことから、IS*Mav6*とIS*Mav6* in *cfp29*の保有率に有意差が認められたことから日本と韓国の*M. avium*が遺伝学的に異なる菌であることが示唆され、国によって*M. avium*の特徴に地域性があると考えられた。IS*Mav6*の挿入位

置やVirulence Factors Database (VFDB)に記載されている病原因子の保有状況をより細かく比較することで、日本と韓国で蔓延している*M. avium*の遺伝学的違いが明らかにできるのではないかと考えられた。また、IS*Mav6* in *cfp29*を保有する株のCluster内に入る菌株は、Cluster内に入らない菌と比較して遺伝学的に特徴があることが示唆された。このことから、Cluster内に存在する菌株とCluster内に存在しない菌株の病原因子などの遺伝子を比較することで、Cluster内に存在する菌株のみが保有する特徴的な遺伝子領域が発見できるのではないかと考えられた。今後、ヨーロッパやアメリカなどの菌株を用いてIS*Mav6*の保有状況や*cfp29*を含むIS*Mav6*のすべての挿入位置の保有状況を比較検討することやMATR-VNTR型別解析法における系統樹解析を行うことで、各国の*M. avium*の特徴が明確になり、日本の*M. avium*の遺伝学的な違いや病原性に関わる因子の特定、さらに日本での*M. avium*増加原因の解明につながると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なご協力をいただきました野崎慎二氏をはじめとする独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床検査科の皆様にご礼申し上げます。また、韓国株を分与していただいたSamsung Medical CenterのWon-Jung Koh氏とSung Jae Shin氏に心より感謝致します。

文 献

- 1) Katoch VM: Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res. 2004 ; 120 : 290-304.
- 2) Falkinham JO 3rd: Nontuberculous mycobacteria in the environment. Clin Chest Med. 2002 ; 23 : 529-551.
- 3) Marras TK, Daley CL: Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. Clin Chest

- Med. 2002 ; 23 : 553–567.
- 4) Sood A, Sreedhar R, Kulkarni P, et al.: Hypersensitivity Pneumonitis-like Granulomatous Lung Disease with Nontuberculous Mycobacteria from Exposure to Hot Water Aerosols. *Environ Health Perspect.* 2007 ; 115 : 262–266.
 - 5) Field SK, Cowie RL: Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria. *Chest* . 2006 ; 129 : 1653–1672.
 - 6) Lamden K, Watson JM, Knerer G, et al.: Opportunist mycobacteria in England and Wales: 1982 to 1994. *Commun Dis Rep CDR Rev.* 1996 ; 6 : 147–151.
 - 7) Moore JE, Kruijshaar ME, Ormerod LP, et al.: Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995–2006. *BMC Public Health.* 2010 ; 10 : 612.
 - 8) Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, et al.: Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in Patients without HIV Infection, New York City. *Emerging Infectious Diseases.* 2008 ; 14 : 390–396.
 - 9) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 ; 175 : 367–416.
 - 10) Ryoo SW, Shin S, Shim MS, et al.: Spread of Nontuberculous Mycobacteria from 1993 to 2006 in Koreans. *J Clin Lab Anal.* 2008 ; 22 : 415–420.
 - 11) Inagaki T, Nishimori K, Yagi T, et al.: Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 : 2156–2164.
 - 12) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 4498–4510.
 - 13) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. *Bull Natl Inst Anim Health.* 2003 ; 109 : 25–32.
 - 14) 森山 誠, 小川賢二, 西森 敬, 他: 臨床由来 *Mycobacterium avium* における Variable Numbers of Tandem Repeats 型別解析法の有用性の検討. *結核.* 2006 ; 81 : 559–566.
 - 15) Mahillon J, Chandler M: Insertion Sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 ; 62 : 725–774.
 - 16) Turenne CY, Wallace R Jr, Behr MA: *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev.* 2007 ; 20 : 205–229.
 - 17) Bartos M, Hlozek P, Svastova P, et al.: Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J Microbiol Methods.* 2006 ; 64 : 333–345.
 - 18) Turenne CY, Semret M, Cousins DV, et al.: Sequencing of *hsp65* Distinguishes among Subsets of the *Mycobacterium avium* Complex. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 433–440.
 - 19) Bono M, Jemmi T, Bernasconi C, et al.: Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl Environ Microbiol.* 1995 ; 61 : 371–373.
 - 20) Pavlik I, Svastova P, Bartl J, et al.: Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 ; 7 : 212–217.
 - 21) Alvarez J, García IG, Aranaz A, et al.: Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: molecular characterization for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol.* 2008 ; 46 : 1246–1251.
 - 22) Ichikawa K, Yagi T, Moriyama M, et al.: Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, IS*Mav6*. *J Med Microbiol.* 2009 ; 58 : 945–950.
 - 23) Rosenkrands I, Rasmussen PB, Carnio M, et al.: Identification and Characterization of a 29-Kilodalton Protein from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Recognized by Mouse Memory Effector Cells. *Infect Immun.* 1998 ; 66 : 2728–2735.
 - 24) Smole SC, McAleese F, Ngampasutadol J, et al.: Clinical and Epidemiological Correlates of Genotypes within the *Mycobacterium avium* Complex Defined by Restriction and Sequence Analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 3374–3380.

Original Article

A STUDY OF GENETIC CHARACTERISTICS OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* STRAINS FROM PATIENTS WITH PULMONARY *M. AVIUM* DISEASE IN JAPAN AND KOREA

^{1,3}Masaki NIIMI, ³Kei-ichi UCHIYA, ⁴Tetsuya YAGI, ^{1,5}Hiroyasu TAKAHASHI,
^{1,3}Kazuhiro KUROKAWA, ^{1,6}Kazuya ICHIKAWA, ^{1,3,7}Takayuki INAGAKI, ^{1,3,8}Makoto MORIYAMA,
³Toshiaki NIKAI, ²Yuta HAYASHI, ^{1,2}Taku NAKAGAWA, and ^{1,2}Kenji OGAWA

Abstract [Introduction] To determine the characteristics of *Mycobacterium avium* in Japan, we compared the genetic properties of *M. avium* isolated in different countries.

[Methods] A *Mycobacterium avium* tandem-repeat variable-number tandem-repeat (MATR-VNTR) analysis was performed using South Korean strains (n=119) and Japanese strains (n=76). In addition, we compared the frequencies of a new insertion sequence, IS*Mav6*.

[Results] A phylogenetic analysis identified different clusters between the two countries' strains. The prevalence of IS*Mav6* was significantly different between them, i.e., 75.0% in Japanese strains and 59.8% in the Korean ones ($P < 0.035$). The frequency of strains with IS*Mav6* in the *Shine-Dalgarno* (SD) sequence of the *cfp29* gene that is involved in the interferon- γ induction was also different, with stronger significance (Japan: 38.2%, Korea: 12.4%, $P < 0.001$).

[Discussion] It is possible that *M. avium* strains prevalent in Japan and in Korea are genetically distinct. The analyses of the presence of IS*Mav6*, as well as the VNTR patterns of *M. avium* strains from many different countries would be a promising methodology in elucidating the causes of the recent increase in cases of pulmonary MAC diseases.

Key words : *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium* tandem-repeat variable-number tandem-repeat (MATR-VNTR) analysis, IS*Mav6*, *cfp29*, Formed cluster

¹Department of Clinical Research, and ²Department of Pulmonary Medicine, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital, ³Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University, ⁴Department of Infectious Diseases, Center of National University Hospital for Infection Control, Nagoya University Hospital, ⁵Department of Pharmacy, Kainan Hospital Aichi Prefectural Welfare Federation of Agricultural Cooperatives, ⁶Department of Pharmacy, Nagoya University Hospital, ⁷Department of Pharmacy, Japanese Red Cross Takayama Hospital, ⁸Department of Pharmacy, National Hospital Organization Nagoya Medical Center

Correspondence to: Kei-ichi Uchiya, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya-shi, Aichi 468-8503 Japan.
(E-mail: kuchiya@meijo-u.ac.jp)